

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100246932 B1
(43)Date of publication of application: 08.12.1999

(21)Application number: 1019970047147
(22)Date of filing: 12.09.1997

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
(72)Inventor: CHOI, UI SEONG
JUNG, BONG HYEON
KANG, HYEON A
KIM, SU JEONG
LEE, SANG GI

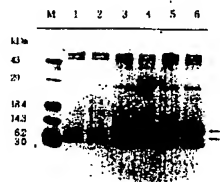
(51)Int. Cl. C12N 1/19
C12N 15/14

(54) YAP3 DELETED YEAST STRAIN AND METHOD FOR MANUFACTURING HUMAN PARATHYROID HORMONE

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a method for manufacturing human parathyroid hormone (hPTH) in a high yield by minimizing the decomposition of hPTH using YAP3 deleted yeast strain.

CONSTITUTION: A method for manufacturing human parathyroid hormone (hPTH) is characterized by the next steps of: i) separating a gene segment coding hPTH; ii) subcloning the gene, making plasmid pB-hPTH, and devising a vector for the expression of hPTH; iii) making 2,700 base pairs of yeast DNA segment containing yap3 gene and yap3 gene deleted YAP3 gene and inserted with leu2 gene; iv) selecting YAP3 deleted yeast strain; v) transforming the yeast strain 334-HY with an expression vector and manufacturing a transformant; and vi) centrifuging the transformant (KCTC 0363BP).



M: Prestained protein molecular weight marker
1: Saccharomyces cerevisiae 334
2: Saccharomyces cerevisiae 334
3: Saccharomyces cerevisiae 334/pG10-hPTH
4: Saccharomyces cerevisiae 334/pG10-hPTH
5: Saccharomyces cerevisiae 334-HY/pG10-hPTH
6: Saccharomyces cerevisiae 334-HY/pG10-hPTH
i: intact hPTH (1-84)
d: cleaved hPTH (27-84)

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of final disposal of an application (19990910)

Patent registration number (1002469320000)

Date of registration (19991208)

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6
C12N 1/19
C12N 15/14

(45) 공고일자 2000년0
(11) 공고번호 10-0246
(24) 등록일자 1999년1

(21) 출원번호	10-1997-0047147	(65) 공개번호	특1999-C
(22) 출원일자	1997년09월12일	(43) 공개일자	1999년04
(73) 특허권자	한국과학기술연구원 박호군 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1		
(72) 발명자	정봉현 대전광역시 서구 월평동 누리아파트 113동 607호 김수정 대전광역시 유성구 신성동 124-15(202호) 1동 3반 이상기 서울특별시 광진구 광장동 극동빌라 가동 101호 강현아 대전광역시 서구 갈마동 경성큰마을아파트 125동 1501호 최의성 대전광역시 유성구 궁동 395-3 다슬아파트 102동507호		
(74) 대리인	이덕록		

심사관 : 김형준

(54) YAP3 유전자가 결손된 신규한 효모균주 및 그를 이용한 재조합 인체 부갑상선호르몬의 생산

요약

본 발명은 효모로부터 인체 부갑상선 호르몬(human parathyroid hormone: hPTH)을 효율적으로 생산하는 것으로 단백질 분해 효소인 효모 아스파틱 프로테아제 3(Yeast Aspartic Protease 3: YAP3) 결손 균주 인체 부갑상선 호르몬의 분해를 최소화함으로써 완전한 형태의 인체 부갑상선 호르몬을 생산하는 방법을

대표도

도2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 YAP3 유전자가 포함된 약 2700 염기쌍의 효모 DNA 단편 및 YAP3 유전자 일부가 제거되고 그대신 전자가 삽입되어 파손된 yap3 유전자(yap3 : : LEU2)를 나타낸 것이다.

도 2는 형질전환되지 않은 효모 균주(사카로마이세스 세레비지애 334), 형질전환된 YAP3 유전자 포함균주(이세스 세레비지애 334/pG10-hPTH1) 및 형질전환된 YAP3 유전자 결손균주(사카로마이세스 세레비지애 HY/pG10-hPTH1)를 20시간 배양한 후 인체 부갑상선 호르몬의 분비 생산을 SDS-PAGE로 비교한 것이다

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 효모로부터 인체 부갑상선호르몬 (human parathyroid hormone; 이하 hPTH라 함)을 효율적으로 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 효모 아스파틱 프로테아제 3(yeast aspartic protease 3; 이하 YAP3 자가 결손된 효모를 이용하여 hPTH의 분해를 최소화하면서 완전한 형태의 hPTH를 고수를 생산하는 방법이다.

인체 부갑상선호르몬은 인체의 부갑상선에서 생산되는, 84개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 호르몬이다. 뼈에서 칼슘의 항상성을 조절하는 기능을 하며, 인체에 적은 양만을 투여하여도 신진대사나 뼈형성에 다. 따라서 이러한 생물학적 활성 때문에 인체 부갑상선호르몬은 골다공증 치료제로서 개발되고 있다(Mo Grrep, R. O., Vol. 39, Academic press, 271(1983); Norman, A. W. et al., Endocrinal. Rev., 3, 336(1

사카로마이세스 세레비지애(Sacharomyces cerevisia)는 현재 숙주-벡터(host-vector)계가 가장 잘 확립 효모로서, 생리학적 및 분자생물학적으로 많은 연구가 진행되어 있다. 이는 인체에 대해 병원성이 없고(n pathogenic), 내독소를 생산하지 않는 GRAS(generally recognized as safe) 미생물로, 유전자 재조합 기 이중 단백질 생산용 숙주 세포로서 그 중요성이 더욱 커지고 있다. 또한 효모용 분비 시그널을 사용할 경 중 단백질을 균체 외로 분비시킬 수 있으므로 분리 정제 비용을 절감할 수 있다는 장점도 있다. 이와 같은 세스 세레비지애를 이용하여 인체 부갑상선 호르몬을 분비 생산하면 생산 경비를 낮출 수 있으나, 이 경우 세스 세레비지애에서 분비단백질로 발현되는 인체 부갑상선 호르몬은 숙주내 프로테아제(protease)에 의 분해가 일어남으로써 84개의 완전한 아미노산으로 구성된 성숙 부갑상선 호르몬을 수득하기 어렵다는 문 (Gabrielson O. S. et al., Gene, 33, 262(1990)). 이러한 프로테아제에 의한 단백질의 절단은 재조합 단백 생산을 위한 효모의 사용에 있어서 가장 큰 장애물 중 하나이다.

인체 부갑상선호르몬이 절단된 형태로 제조하는데 있어 가장 큰 요인은 KEX2 단백질 가수분해 효소의 기 으로 추정된 바 있다(Gabrielson O. S. et al., Gene, 33, 262(1990)). 따라서 인체 부갑상선호르몬의 단백 응을 억제하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어 레베등은 완전한 인체 부갑상선호르몬의 아미. 26번째 아미노산인 라이신을 글루타민으로 치환함으로써 KEX2에 의한 단백질의 절단에 대해 저항성을 가 적 활성이 완전한 인체 부갑상선호르몬과 동일한 인체 부갑상선호르몬 변이체를 제조한 바 있고(Reppe S Biol. Chem., 266, 14198(1991)), 리안등은 유전자 재조합 기술을 이용하여 효모 유비퀴틴(ubiquitin) 유 단에 인체 부갑상선호르몬 관련 단백질 (human parathyroid hormone related protein)을 직접 연결하여 은 인체 부갑상선호르몬 관련 단백질을 제조한 바 있다(Rian E. et al., Eur. J. Biochem., 213, 641(1993) 단백질 변이체는 일반적으로 새로운 의약품으로 간주되기 때문에 이의 안정성을 인정받기 위해 매우 어려 구되며 유전자 융합 기술의 사용은 예상되는 절단반응에 의해 융합부위가 반드시 제거되어야 함은 물론 불 단백질에는 불필요한 융합 부위가 추가로 포함되어 있어 원하는 단백질의 수율이 상대적으로 낮은 단점이

한편, 단백질 분해 효소에 의한 분비 시그널 서열 (signal sequence)의 프리 (pre) 또는 프로 (pro) 부분의 단백질의 분비에 필수적이나 원하지 않는 부위에서의 단백질의 절단은 재조합 단백질 생산에 큰 문제가 된 모 사카로마이세스 세레비지애의 YAP3 (Yeast Aspartic Protease 3)는 세포질 막에 부착되어 있는 단백질 서 (Ash J. et al., J. Biol. Chem. 270, 20847(1995)) 하나 또는 한 쌍으로 되어있는 염기성 아미노산들로 분 또는 중간 부분을 인지하여 절단을 일으킨다 (Cawley N. X. et al., J. Biol. Chem. 271, 4168(1996)). YAP3의 주된 생리적 기능은 아직 명확하지 않으나 KEX2 단백질 분해 효소 부재시 프로 알파 팩터 (pro-c factor)의 공정에 관여하며 (Egel-Mitani M. et al. Yeast, 6, 127 (1996)) 효모에서 발현된 외래 단백질인 스타틴(prosomatostatin)의 공정에도 관여한다고 알려져 있다 (Bourbonnais Y. et al., EMBO J. 12, 285 한 분리 정제된 YAP3는 시험관상에서 펩타이드 계통의 여러 프로호르몬(prohormones)들 예를들면, 인체 티코트로핀 (human adrenocorticotropin), 소의 프로인슐린 (bovine proinsulin), 돼지 콜레시스토키닌 (p cholecystokinin), 및 인체 혈장 알부민을 기질로 하여 단백질 절단을 일으킬 수 있음이 보고되었다 (Cawl al., J. Biol. Chem. 271, 4168(1996), Ledgerwood E. C. et al. FEBS Lett. 383, 67(1996)). 이는 외래 효모에서 발현 분비하고자 할 때 YAP3에 의해 원하지 않는 단백질 분해가 유발될 가능성이 매우 큼을 시 에도, 효모 배양 배지가 산성화되면서 촉진되는 재조합 단백질의 분해 양상이 YAP3의 최적 pH(pH 4.5, A V. et al., J. Biol. Chem. 268, 11968(1993))와 밀접한 상관관계를 보인다는 사실도 효모에서 발현 분비 단백질들이 YAP3에 의해 분해될 가능성을 강력히 뒷받침해 주고있다. 따라서 YAP3의 활성이 결핍된 효모 합 분비 단백질의 대량생산을 위한 숙주세포로서 매우 유용할 것으로 기대된다.

그러나, 인체 부갑상선 호르몬의 경우도 사카로마이세스 세레비지애에서 분비 단백질로 발현시킬 경우 단 일어나 84개의 완전한 아미노산을 지닌 성숙 부갑상선호르몬을 수득하기 어렵다는 문제점이 있다. 인체 호르몬은 주로 KEX2에 의해 단백질 절단이 일어나는 펩타이드 호르몬으로 생각되어왔으나(Gabrielson O. S. et al. 33, 262(1990)), 그 절단 부위가 YAP3가 인지할 수 있는 한 쌍의 염기성 아미노산들(Arg25와 Lys26)의 C이며 세포 밖에서 인체 부갑상선 호르몬 절단이 상당히 진행된다(Chung, B. H. and Park, K. S., Biotech Bioeng., in press)는 사실들은 YAP3가 효모에서 발현 분비되는 재조합 인체 부갑상선 호르몬의 절단을

된 단백질 분해 효소의 하나일 가능성을 시사한다.

이와같은 가정하에서 본 발명의 목적은 효모로부터 인체 부갑상선 호르몬(human parathyroid gland hormone)을 효율적으로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 단백질 분해 효소 YAP3 결손 균주를 제작하여 인체 부갑상선 호르몬의 발현 숙주 균주로 사용함으로써 재조합 사카로마이세스 세레비지애에서 분비되는 인체 부갑상선 호르몬을 획기적으로 감소시키는 방법을 제공한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 인체 부갑상선호르몬의 절단을 일으키는 주된 단백질 분해 효소 YAP3의 결손 균주를 제작하는 체 부갑상선 호르몬의 분해를 최소화하여 완전한 형태의 인체 부갑상선 호르몬을 고수율로 생산하는 공정이다. 즉, 공정별 설명에 기재한 바와같이 인체 부갑상선호르몬의 발현 벡터인 pG10-hPTH1을 제조한 후 효소 YAP3 결손 효모 균주334-HY(MAT α pep4-3 prb1-1122 ura3-52 leu2-3,112 reg1-510 gal1 yap3 Δ)를 제조하고 상기 벡터 pG10-hPTH1을 상기 숙주 세포에 형질 전환시켜 사카로마이세스 세레비지애 334 hPTH1 (KCTC 0363BP)를 제작하여 배양함으로써 프로테아제에 의해 절단되지 않은 안정한 형태의 hPTH1 단백을 포함한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 본 발명의 권리범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

제1공정 : 인체 부갑상선호르몬 발현 벡터의 제작hPTH유전자 단편의 분리인체 부갑상선 호르몬(hPTH)을 전자를 합성하기 위하여, 하기 서열들을 갖는 12개의 올리고뉴클레오타이드 N1, N2, N3, N4, N5, N6, C1, C4, C5 및 C6를 DNA 합성기(Takara사(일본)제품, Model Expedite 8909)로 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드 발현되는 양을 증가시키기 위하여 효모에 적합한 코돈으로 치환하여 주었다(Herman, A. B. & Rob, A. K Gene Expression, In W. Reznikoff ad L. Gold(eds), Butherworths, Boston, 225-286(1986)).

C1: 3'-TA TTT TCC AGA CAA AGA CTT TAA GTT AAC TAC GTG TTG AAC CCA TTC GTG AAC TTG-5'
C2: 3'-AGA TAC CTT TCT CAA CTT ACC AAC TCT TTC TTC AAC GTT CTG CAA-5' (45 mer)
C3: 3'-AAG CAA CGA AAC CCA CGA GGT AAC CGA GGT TCT CTC CGA-5'(45 mer)
C4: 3'-CCA AGA GTT TCT TTC TTC CTT CTG TTG CAA AAC CAA CTT-5'(45 mer)
C5: 3'-AGA GTG CTT TTC AGA AAC CC CTG TTC CGA CTG CAA TTG-5'(45mer)
C6: 3'-CAA AAC TGG TTC CGA TTC AGA GTT ATT CAG C1 (45 mer)
N1: 5'-CTA GAT AAA AGG TCT GTT TCT GAA ATT CAA TTG ATG CAC AAC TTG GGT AAG-3'
N2: 5'-CAC TTG AAC TCT ATG GAA AGA GTT GAA TGG TTG AGA AAG AAG TTG-3'(45 mer)
N3: 5'-CAC AAC TTC GTT GCT TTG GGT GCT CCA TTG GCT CCA-3'(45 mer)
N4: 5'-AGA GAC GCT GGT TGA CCA AGA AAG AAG GAA GAC AAC GTT-3'(45 mer)
N5: 5'-TTG GTT GAA TCT CAC GAA AAG GGT GAA GCT GAC AAG GCT-3'(45 mer)
N6: 5'-GAC GTT AAC GTT TTG ACC AAG GCT AAG TCT (37 mer)
상기 올리고뉴클레오타이드 N1, N2, N3, N4, N5, N6, C1, C2, C3, C4, C5 및 C6를 각각 폴리아미드 인산화효소(T4 polynucleotide Kinase, 베링거 만하임사)로 37°C에서 30분동안 인산화시킨 다음, 올리고뉴클레오타이드를 동일 물농도로 혼합하여 회합(annealing) 반응으로 이중체를 형성시켰다. 리가제(T4 DNA 리가제 만하임사)로 각각의 올리고뉴클레오타이드를 연결한 다음 아가로오즈 젤 전기영동하여 젤로부터 인체 부갑상선호르몬을 코드하는 약 272 염기쌍의 hPTH 유전자 단편을 분리하였다.

플라스미드 pG10-hPTH1의 제작플라스미드 pBluescript KS⁺(Stratagene)를 제한효소 XbaI 및 SalI으로 절단하여 아가로스 젤 전기영동한 후 DNA 단편을 분리하였다. 여기에 상기 단계에서 합성한 hPTH 유전자를 서브클로닝(subcloning)하여 플라스미드 pB-hPTH를 제작하였다.

한편, 플라스미드 YEG α -HIR525(KCTC 8518P)를 제한효소 BamHI 및 SalI으로 절단하여 약, 5,500 염기쌍의 DNA 단편을 분리하였다. 또한 플라스미드 YEG α -HIR525를 제한효소 BamHI과 XbaI으로 절단하여 GAL10 프로모터 포함하는 약 830 염기쌍의 단편 2를 분리하였다. 이어서 상기에서 제조한 플라스미드 pB-hPTH를 제한효소 SalI으로 절단하고, 여기에 상기 단편 1 및 단편 2를 연결하여 플라스미드 pG10-hPTH1을 제작하였다.

플라스미드 pG10-hPTH1은 GAL10 프로모터 : : pPL : : hPTH 유전자 : : GAL7 터미네이터를 순서적으로 포함하고 있다. ATG 개시코돈으로 시작되는 pPL은 총 85개의 아미노산으로 이루어져 있으며, C-말단의 84번째 아미노산은 각각 라이신 및 아르기닌이며, 이들 라이신-아르기닌 서열 다음에는 hPTH의 N-말단 세린(Ser)-

코돈인 TCT로부터 시작되는 완전한 hPTH 유전자가 연결되어 있다. 라이신-아르기닌 배열을 인식하는 프 yscF(KEX2 유전자의 발현물)는 효모의 트랜스 골지체에 존재하며, 합성된 ppl : : hPTH 유전자의 폴리펩 랜스 골지체에서 프로세싱되어 분비 시그널 부분이 떨어져 나가게 된다. 따라서 배지로 분비되는 hPTH의 Ser으로 시작되는 완전한 형태의 인체 부갑상선 호르몬이라 할 수 있다.

제2공정 : 단백질 분해 효소 YAP3결손 효모 균주 제작플라스미드 T7-yap3:: LEU2의 제작YAP3의 활성으로 숙주를 유전자 파열(gene disruption) 방법으로 제작하기 위해 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction)을 통해 효모 염색체 DNA로부터 YAP3 전체 유전자(1700 염기쌍)가 포함된 약 2700 염기쌍 크기의 효모 증폭하였다. 폴리머라제 연쇄 반응에 사용된 프라이머(primer)는 YAP3 유전자 부근의 염기서열을 기초로 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 YAPU-1(5'CGGATCCGCTTCCAGTATACGCTCTAC3')와 YAPR-1 (5'TATAGATTATTCTAGATGCCAAACG 3')이다.

상기 방법으로 얻어진 DNA 단편을 플라스미드 pT7Blue(R) (Novagen)에 서브클로닝하여 플라스미드 T7-작하였다. YAP3 유전자 일부가 제거되고 그대신에 LEU2 유전자가 삽입되어 있는 파손된 yap3 유전자(yap3-)를 제조하기 위하여 플라스미드 T7-YAP3를 AflIII와 NcoI으로 절단한 후 크리나우 프래그먼트 (Klenow fragment)와 알칼린 포스파타제(alkaline phosphatase) 처리를 하여 YAP3 프로모터(promoter)와 유전자 일부가 4000 염기쌍의 플라스미드 단편을 분리하였다. 플라스미드 YEp351 (Hill, J. E., et al., Yeast 2, 163 (1984)으로 절단하여 얻은 약 2000 염기쌍 크기의 LEU2 유전자 단편을 상기 플라스미드 단편과 연결하여 플라스미드 yap3::LEU2를 제조하였다.

도 1은 폴리머라제 연쇄 반응을 통하여 효모 염색체 DNA로부터 얻어진YAP3 유전자가 포함된 약 2700 염기쌍의 DNA 단편 및 YAP3 유전자 일부가 제거되고 그대신에 LEU2 유전자가 삽입되어 있는 파손된 yap3 유전자(yap3::LEU2)를 보여준다.

YAP3 결손 균주 334-HY의 선별상기 단계에서 제작된 플라스미드 T7-yap3::LEU2를 NdeI과 SacI으로 절단한 후 등의 방법 (Ito et al., J. Bacteriol. 153, 163(1993))에 따라 사카로마이세스 세레비지에 균주 334 (KC 형질전환시켜 LEU2+로 전환된 균주를 얻었다. 이들 효모 형질 전환체의 염색체 DNA를 여러 제한 효소로 처리한 후 Southern blot 분석을 통하여 YAP3 유전자가 파열됨을 확인함으로써 YAP3의 활성이 결손된 균주 334-HY (MAT α pep4-3 prb1-1122 ura3-52 leu2-3,112 reg1-501 gal1 yap3::LEU2)를 선별하였다.

신규한 형질전환된 효모 세포주 제조 상기 단계에서 제조된 YAP3 결손 균주 334-HY를 제1공정에서 제조된 부갑상선 호르몬의 발현 벡터인 pG10-hPTH1으로 형질전환 시킨 후 URA3+로 전환된 균주를 선별하여 인체 부갑상선 호르몬 발현 효모 균주, 즉 사카로마이세스 세레비지에 334-HY/pG10-hPTH1 세포주를 제조하였다. 이는 1997년 8월 8일 생명공학연구소에 기탁번호 KCTC 0363BP로 기탁하였다.

실시예 1 : 인체 부갑상선호르몬을 발현하는 형질전환된 효모 세포주의 생산YAP3 결손 균주 334-HY를 YEP 배지에 1% 포도당, 2% 박토 펩톤, 2% 포도당 2%) 10ml에서 30℃, 하룻밤동안 진탕으로 전배양한 뒤, 그 배양액을 50ml YPD 배지에 접종하여 600nm에서 흡광도(O.D.

600)가 0.4가 될 때까지 30℃, 진탕 배양하였다. 이 배양액 50ml를 수득하여 4,000rpm에서 5분간 원심분리를 제거한 후 증류수 25 내지 50ml로 세척한다. Lithium acetate/TE(10mM 트리스-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)를 현탁하였다. 상기 현탁액 100 μ l에 상기 제1공정에서 제조한 벡터 pG10-hPTH1 7 μ l과 salmon sperm DNA, PEG/LiAc(폴리에틸렌글리콜 4,000이 50%, 0.1M 리튬 아세테이트 10%, 0.1M TE 완충용액 10%)를 혼합한 후, 30℃에서 30분 동안 진탕 배양한다. 여기에 DMSO 70 μ l를 넣어 잘 현탁한 후, 42℃에서 5분간 충격을 가하고 0℃에서 냉각한다. 이어서 15,000rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 버리고 500 μ l의 TE에 현탁시킨 후 현탁액을 최소 선택 배지(아미노산 부재의 효모 질소 기질 0.67%, 포도당 2%, Casamino acid 0.5%)에 30℃로 3일간 배양하여 형질전환된 사카로마이세스 세레비지에 334-HY/pG10-hPTH1(KCTC 0363BP)을 얻었다.

실시예 2 : 단백질 분해 효소 YAP3 유전자 결손 효모 균주로 형질 전환된 효모 세포주의 배양 및 발현상기 얻은 형질 전환된 세포주 사카로마이세스 세레비지에 334-HY/pG10-hPTH1을 액체 최소 선택 배지(아미노산 부재의 효모 질소 기질 0.67%, 포도당 2%, Casamino acid 0.5%)에 접종하여 30℃에서 24시간동안 전배양한 후, 배지(효모 추출물 1%, 박토 펩톤 2%, 포도당 1%, 갈락토스 1%)에 2% 접종하여 30℃에서 20시간동안 배양한 후 수득된 배양액 500 μ l를 5,000rpm에서 5분간 원심분리하여 배양 상층액과 균체를 회수하였다. 각 배양액에 DOC(deoxycholic acid)용액과 TCA(trichloroacetic acid) 용액을 배양액의 1/10 부피로 넣어 배지내에 존재하는 단백질을 0℃에서 30분 동안 침전시킨 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 단백질을 용액에서 제거하기 위하여 아세톤으로 세척한 후 용해 완충액(12mM 트리스-Cl, pH 6.8, 5% 글리세롤, 2.88% 에탄올, 0.4% SDS, 0.02% 브로모페놀 블루) 25 μ l에 녹이고 100℃에서 5분간 가열하여 배양액 단백질을 용해하였다. 각 10 μ l의 배양액 단백질을 0.75mm 두께로 15% 분리 겔(separating gel : pH 6.8, 가로 11cm)을 덮은 폴리아크릴아미드 겔로 로딩한 후 125V, 25mA로 1시간 30분 동안 전기 영동하고 쿠마시 염

색하였다.

실시에3 (비교) : 단백질 분해 효소 YAP3를 결손시키지 않은 균주로 형질 전환된 효모 세포주의 배

YAP3 결손 균주가 아닌 사카로마이세스 세레비자에 334(MAT α pep4-3 prb1-1122 ura3-52 leu -3,112 gal1)와 사카로마이세스 세레비자에 334를 인체 부갑상선 호르몬 발현 벡터인 pG10-hPTH1으로 형질전: 사카로마이세스 세레비자에 334/pG10-hPTH1을 실시에 2와 동일하게 배양 및 전기 영동하여 쿠마시 염색하였다.

이상의 형질전환되지 않은 효모균주(사카로마이세스 세레비자에 334), 형질전환된 YAP3 유전자 포함균주 이세스 세레비자에 334/pG10-hPTH1) 및 형질전환된 YAP3 유전자 결손균주(사카로마이세스 세레비자에 HY/pG10-hPTH1) 에서 인체 부갑상선 호르몬의 분비 생산을 SDS-PAGE 상에서 비교한 결과를 도 2에 그 결과 형질전환되지 않은 균주에서는 hPTH가 전혀 발현되지 않았으며, 단백질 분해 효소 YAP3를 가진 한 경우에는 발현된 hPTH중 약 50% 이상이 절단된 hPTH로 존재하였다. 그러나 YAP3 결손 균주인 사카. 세레비자에 334-HY/pG10-hPTH1를 배양한 경우 절단된 hPTH가 5% 이하였으며 발현된 hPTH의 95% (한 형태의 hPTH로 존재하였다.

도 2와 같이 SDS-PAGE 상에서 분리된 i 밴드와 d 밴드에 해당하는 단백질들을 PVDF(polyvinylidene difl 전사한 후 Milligen/Biosearch M 6000 단백질 시퀀서를 이용 N-말단 아미노산 분석을 하였다. 그 결과 i 말단 아미노산 서열은 Ser-Val-Ser-Glu-Ile로 나타났으며, d 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 Lys-Leu Val로 나타났다. 이상의 결과로써 i 밴드에 해당하는 단백질은 완전한 형태의 hPTH(1-84)이며 d 밴드에 단백질은 N-말단 26개의 아미노산이 손실된 절단된 형태의 hPTH(27-84)임을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

이상 설명한 바와같이, 본 발명은 단백질 분해 효소 YAP3 결손 효모 균주에 hPTH를 형질 전환시켜 배양한 분해효소에 의한 hPTH의 절단을 최소화함으로써 완전한 형태의 인체 부갑상선호르몬을 높은 수율로 얻을 약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

(57)청구의 범위

청구항1

단백질 분해효소 YAP3 유전자가 결손된 효모균주로 형질전환된 신규한 효모사카로마이세스 세레비자에 HY/pG10-hPTH1 (KCTC 0363BP).

청구항2

인체 부갑상선호르몬(hPTH)을 코딩하는 유전자 단편을 분리하는 단계와; 상기 유전자를 서브클로닝하여 pB-hPTH를 제작하고 이어서 인체 부갑상선 호르몬을 발현하여 벡터를 제작하는 단계와; 폴리머라제 연소 하여 효모염색체 DNA로부터 얻어진 YAP3유전자가 포함된 약 2700염기쌍의 효모 DNA단편 및 YAP3유전 제거되고 그 대신 LEU2유전자가 삽입되어 있는 파손된 yap3유전자를 제작하는 단계와; YAP3결손 효모균 는 단계와; YAP3 결손 효모균주 334-HY를 상기 단계에서 제작한 인체부갑상선 호르몬 발현벡터로 형질전 신규한 형질전환된 효모세포주를 생산하는 단계와; 상기 형질전환된 효모세포주(KCTC 0363BP)를 배양 하여 회수하는 단계로 구성됨을 특징으로 하는 재조합 인체 부갑상선호르몬의 생산방법.

청구항3

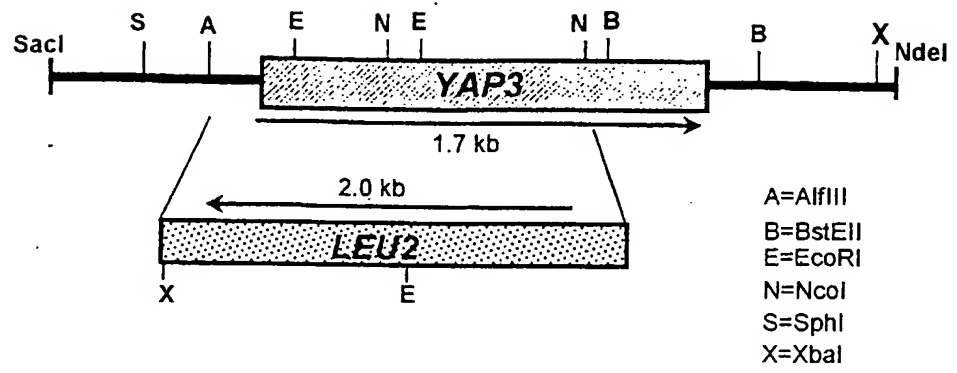
제2항에 있어서, 상기 재조합 인체 갑상선호르몬을 발현하는 벡터가 pG10-hPTH1인 방법.

청구항4

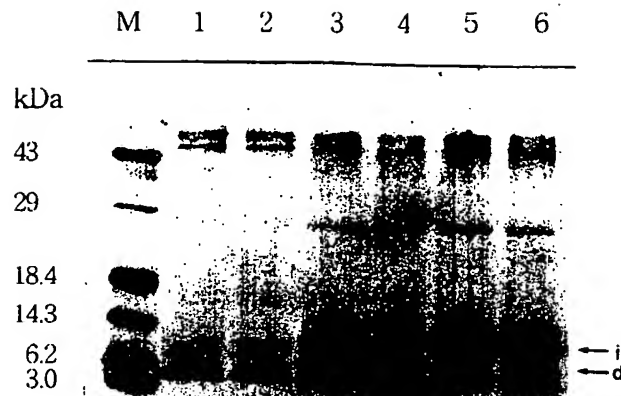
제2항에 있어서, 파손된 yap3 유전자가 yap3::LEU2인 방법.

도면

도면1



도면2



M : Prestained protein molecular weight marker

1 : 사카로마이세스 세레비지애 334

2 : 사카로마이세스 세레비지애 334

3 : 사카로마이세스 세레비지애 334/pG10-hPTH1

4 : 사카로마이세스 세레비지애 334/pG10-hPTH1

5 : 사카로마이세스 세레비지애 334-HY/pG10-hPTH1

6 : 사카로마이세스 세레비지애 334-IIY/pG10-hPTH1

i : intact hPTH (1-84)

d : cleaved hPTH (27-84)